

## Detecção de Patógenos Causadores de Enfezamento no Estado do Paraná na Safrinha 2019



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
204**

**Detecção de Patógenos Causadores  
de Enfezamento no Estado do  
Paraná na Safrinha 2019**

Luciano Viana Cota  
Dagma Dionísia da Silva  
Walter Fernandes Meirelles  
Isabel Regina Prazeres de Souza  
Ivênio Rubens de Oliveira  
Rodrigo Vêras da Costa  
Simone Martins Mendes

***Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2020***

**Esta publicação está disponível no endereço:**  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

**Embrapa Milho e Sorgo**  
Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Maria Marta Pastina*

Secretária-Executiva  
*Elena Charlotte Landau*

Membros  
*Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Maria Cristina Dias Paes*

Revisão de texto  
*Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica  
*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

Tratamento das ilustrações  
*Mônica Aparecida de Castro*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Mônica Aparecida de Castro*

Foto da capa  
*Luciano Viana Cota*

**1ª edição**  
*Publicação digitalizada (2020)*

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Nome da unidade catalogadora

---

Detecção de patógenos causadores de enfezamento no estado do Paraná na safrinha 2019 / Luciano Viana Cota ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2020.  
14 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 204).

1. Doença de planta. 2. Zea mays. 3. Patógeno. I. Cota, Luciano Viana. II. Silva, Dagma Dionísia da. III. Meirelles, Walter Fernandes. IV. Souza, Isabel Regina Prazeres de. V. Oliveira, Ivênio Rubens de. VI. Costa, Rodrigo Vêras da. VII. Mendes, Simone Martins. VIII. Série.

CDD 632.4 (21. ed.)

# Sumário

---

Resumo .....05

Abstract .....07

Introdução.....08

Material e Métodos .....09

Resultados e Discussão .....11

Conclusão.....12

Referências .....12

# Detecção de Patógenos Causadores de Enfezamento no Estado do Paraná na Safrinha 2019

Luciano Viana Cota<sup>1</sup>

Dagma Dionísia da Silva<sup>2</sup>

Walter Fernandes Meirelles<sup>3</sup>

Isabel Regina Prazeres de Souza<sup>4</sup>

Ivênio Rubens de Oliveira<sup>5</sup>

Rodrigo Vêras da Costa<sup>6</sup>

Simone Martins Mendes<sup>7</sup>

**Resumo** – Entre as doenças que incidem na cultura do milho destacam-se os enfezamentos. Eles têm sido doenças preocupantes nas últimas safras, com perdas severas em diversas regiões do país. Em milho, dois sintomas de enfezamento são conhecidos, enfezamento-pálido e enfezamento-vermelho, ocasionados pelo procarionte *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb (*Corn stunt spyroplasma*) e por *Phytoplasma* (*Maize bushy stunt phytoplasma*), respectivamente. Para o adequado manejo dos enfezamentos são imprescindíveis o diagnóstico correto e a identificação do patógeno. Neste trabalho objetivou-se identificar quais patógenos causam enfezamentos em milho no estado do Paraná. Locais com relato de ocorrência de enfezamentos na cultura do milho na safrinha 2019 no Paraná foram visitados para coleta das amostras. As análises para detecção de espiroplasma e fitoplasma foram realizadas empregando-se primers específicos. Foram coletadas 30 amostras em quatro municípios do Paraná. Em 15 amostras (50%) foi detectada a presença do espiroplasma. Em 50% das amostras de plantas com sintomas de enfezamento não se detectou a presença do espiroplasma ou fitoplasma. Baseado nos resultados das amostras analisadas, o agente causal dos enfezamentos presente nas lavouras de milho, nos municípios

---

1. Eng. Agrôn., DCs em Agronomia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

2. Eng. Agrôn., DSc em Agronomia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

3. Eng. Agrôn., DSc em Genética e Melhoramento, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

4. Eng. Agrôn., DSc em Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

5. Eng. Agrôn., DSc em Fitotecnica, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

6. Eng. Agrôn., DSc em Agronomia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

7. Eng. Agrôn., DSc em Agronomia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

amostradas (Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Anahy e Londrina), no Paraná, durante a safrinha de 2019, é o espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*).

**Termos para indexação:** milho, enfezamento, fitoplasma, espiroplasma, *Spiroplasma kunkelii*.

## Detection of Pathogens Causing Stunting in the State of Paraná, Brazil, in the off-Season 2019

**Abstract** – Among the diseases that affect the maize crop, stuntings stand out. They have been a worrying disease in recent seasons, with severe losses in several regions of the country. In maize, two stunting symptoms are known, pale stunting and red stunting, caused by the prokaryote *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb (*Corn stunt spiroplasma*) and *Phytoplasma* (*Maize bushy stunt phytoplasma*), respectively. For the proper management of the stuntings, the correct diagnosis and identification of the pathogen are essential. The aim of this work was to identify which pathogens cause stunting in maize in the state of Paraná, Brazil. Sites with reports of occurrence of the disease in the 2019 maize crop in Paraná were visited to collect the samples. The analysis for the detection of spiroplasma and phytoplasma were performed using specific primers. Thirty samples were collected in four municipalities in Paraná. In 15 samples (50%) the presence of spiroplasma was detected. In 50% of plant samples with symptoms of stunting, the presence of spiroplasma or phytoplasma was not detected. Based on the results of the analyzed samples, the causal agent of the stuntings present in maize fields, in the sampled municipalities (Marechal Cândido Rondon, Mercedes, Anahy and Londrina), in Paraná, during the off-season of 2019, is the spiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*).

**Index terms:** corn, stowage, phytoplasma, spiroplasma, *Spiroplasma kunkelii*.

## Introdução

---

O milho é, na atualidade, uma cultura agrícola chave para o agronegócio brasileiro e para a geração de divisas para o país. É o principal produto destinado a alimentação animal, com destaque para as cadeias produtivas de carnes (suínos, aves e bovinos), leite e rações e, mais recentemente, tem contribuído fortemente para o fortalecimento da balança comercial através de exportações para diversos países no mundo. Nesse sentido, qualquer fator que interfira na produção e/ou na oferta deste cereal, bem como na viabilidade de seu uso para os fins específicos nas diferentes cadeias produtivas supracitadas, resulta em prejuízos de enorme magnitude para a economia brasileira.

Os sistemas de produção de milho no Brasil envolvem duas safras (verão e safrinha). Na safra 2018/2019, foram plantados mais de 17 milhões de hectares, sendo 5 milhões de primeira safra e 12 milhões de safrinha, e uma produção total de 97 milhões de toneladas (Conab, 2019). A produtividade média brasileira é de apenas 5,6 ton/ha. Entre os fatores que contribuem para redução da produtividade média brasileira predominam doenças e pragas (Costa et al., 2017). Entre as doenças que incidem na cultura do milho destacam-se os enfezamentos (Sabato, 2017).

Os enfezamentos do milho têm se destacado entre as doenças mais preocupantes do milho nas últimas safras, com perdas severas em diversas regiões do país (Silva, et al., 2017). As perdas devidas aos enfezamentos podem chegar a 100%, em função da época de infecção e da suscetibilidade da cultivar plantada (Nault, 1990). Os enfezamentos são causados por bactérias da classe Mollicutes, caracterizadas pela ausência de parede celular (Pollack et al., 1997). Os mollicutes infectam as plantas de forma sistêmica, resultante da colonização e infecção dos tecidos do floema. Em milho, dois sintomas de enfezamento são conhecidos, enfezamento-pálido e enfezamento-vermelho, ocasionados pelo procarionte *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb (*Corn stunt spiroplasma*) e por *Phytoplasma* (*Maize bushy stunt phytoplasma*), respectivamente. Ambos os patógenos são transmitidos de forma persistente propagativa pela cigarrinha do milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) (Whitcomb et al., 1986; Firrão et al., 2004; Lee et al., 2000).



As plantas com enfezamento apresentam redução de crescimento e desenvolvimento, entrenós curtos, proliferação e malformação de espigas, espigas improdutivas, enfraquecimento dos colmos com favorecimento de infecções fúngicas que resultam em tombamento. Os sintomas do enfezamento-pálido são caracterizados por estrias cloróticas delimitadas que se iniciam na base das folhas, plantas com altura reduzida, encurtamento de entrenós, brotos nas axilas foliares e cor avermelhada em folhas, podendo ocorrer enfraquecimento dos colmos e proliferação de espigas (Shurtleff, 1986). Já para o enfezamento-vermelho são amarelecimento e/ou avermelhamento das folhas geralmente iniciando pelas bordas, perfilhamento e proliferação de espigas por planta (Shurtleff, 1986).

Para o correto manejo dos enfezamentos é imprescindível o diagnóstico correto e a identificação do patógeno. Atualmente o diagnóstico da doença é baseado na análise dos sintomas, microscopia e emprego de métodos moleculares baseados em PCR (Sabato, 2017; Sousa e Barros, 2017). O diagnóstico baseado em sintomas nem sempre é conclusivo na separação do enfezamento-vermelho do enfezamento-pálido, e às vezes ainda pode ocorrer equívoco com outras doenças e deficiências nutricionais (Sabato, 2017). Neste trabalho objetivou-se identificar quais patógenos causam enfezamentos em milho no estado do Paraná.

## Material e Métodos

---

Foram coletadas amostras em 30 lavouras com relato de ocorrência de enfezamentos na cultura do milho na safrinha 2019 em quatro municípios do Paraná (Tabela 1). Folhas com sintomas de enfezamentos foram coletadas em lavouras com alta incidência da doença. As folhas amostradas foram identificadas e acondicionadas em caixa de isopor com gelo e trazidas para a Embrapa Milho e Sorgo.

**Tabela 1.** Amostras, locais de coleta e resultado de análise molecular para detecção de mollicutes (fitoplasma e espiroplasma) em folhas de milho coletadas no estado do Paraná na safrinha de 2019.

Amostra	Local	Mollicutes	
		Fitoplasma	Espiroplasma
PR1.2019	Marechal C. Rondon		x
PR2.2019	Marechal C. Rondon		x
PR3.2019	Marechal C. Rondon		
PR4.2019	Marechal C. Rondon		
PR5.2019	Marechal C. Rondon		
PR6.2019	Marechal C. Rondon		x
PR7.2019	Marechal C. Rondon		x
PR8.2019	Marechal C. Rondon		x
PR9.2019	Marechal C. Rondon		x
PR10.2019	Marechal C. Rondon		
PR11.2019	Marechal C. Rondon		x
PR12.2019	Marechal C. Rondon		
PR13.2019	Marechal C. Rondon		x
PR14.2019	Marechal C. Rondon		x
PR15.2019	Marechal C. Rondon		
PR16.2019	Mercedes		
PR17.2019	Mercedes		
PR18.2019	Mercedes		x
PR19.2019	Mercedes		x
PR20.2019	Anahy		x
PR21.2019	Anahy		
PR22.2019	Anahy		
PR23.2019	Anahy		
PR24.2019	Anahy		
PR25.2019	Anahy		
PR26.2019	Londrina		x
PR27.2019	Londrina		x
PR28.2019	Londrina		
PR29.2019	Londrina		x
PR30.2019	Londrina		

No Laboratório, as amostras de folhas doentes foram submetidas à extração de DNA, segundo protocolo descrito por Saghai-Maroo et al. (1984). As análises para detecção de espiroplasma e fitoplasma, respectivamente, agentes causais dos enfezamentos, pálido e vermelho, foram realizadas empregando-se primers específicos descritos por Barros et al. (2001) e Lee et al. (1993). Foram utilizados os primers R16F2 e R16R2 para detecção do fitoplasma (Lee et al., 1993) e CSSF2 e CSSR6 para detecção do espiroplasma (Barros et al., 2001). Os produtos dessas reações de PCR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose para confirmação do peso molecular dos fragmentos amplificados. Os protocolos foram realizados conforme descrito por Sousa e Barros (2017).

## Resultados e Discussão

---

Em 15 amostras (50%) foi detectada a presença do espiroplasma. Os espiroplasmas têm maior adaptação para lavouras de milho cujas altitudes são menores, enquanto os fitoplasmas ocorrem em locais de maiores altitudes (Nault, 1980). Considerando as altitudes dos municípios de Marechal Cândido Rondon (420 m), Mercedes (415 m) e Anahy (483 m), a prevalência de espiroplasma em relação à não detecção de fitoplasma nas amostras pode estar associada a esta característica. Estes resultados são importantes para que o uso de cultivares resistentes seja feito, considerando a prevalência do espiroplasma na região amostrada, e que existe diferença entre os genótipos quanto à resistência ao fitoplasma e espiroplasma (Oliveira et al., 2010). Estes resultados corroboram os obtidos por Silva et al. (2019), em que foi detectada apenas presença de espiroplasma em amostras coletadas na região de Marechal Cândido Rondon, no Paraná.

Em 50% das amostras de plantas com sintomas de enfezamento não se detectou a presença do espiroplasma ou fitoplasma (Tabela 1). Este resultado reforça a necessidade de se utilizar um método molecular para confirmar o diagnóstico da doença (Sabato, 2017; Sousa; Barros, 2017). O diagnóstico baseado em sintomas nem sempre é categórico na separação do enfezamento-vermelho do enfezamento-pálido e às vezes ainda pode ocorrer engano com outras doenças e deficiências nutricionais (Sabato, 2017). Neste caso especificamente, a doença pode não ser enfezamento ou a quantidade de patógeno presente nos tecidos doentes estava abaixo do limite de

detecção. O que reforça a necessidade de se desenvolver um método mais sensível para identificação do patógeno.

Considerando os impactos que os enfezamentos causam na cultura do milho é necessária a adoção de medidas de controle da doença no estado do Paraná. O controle mais eficiente dos enfezamentos consiste na utilização de cultivares resistentes. Outras práticas recomendadas para o manejo dessas doenças são: evitar semeaduras sucessivas de milho; fazer o pousio por período de dois a três meses sem a presença de plantas de milho; e alterar a época de semeadura, evitando-se a semeadura tardia da cultura. O uso de inseticidas para o controle do inseto-vetor não tem apresentado eficiência satisfatória na redução da incidência dos enfezamentos, porém existem produtos registrados no Mapa.

## Conclusão

---

Baseado nos resultados das amostras analisadas, o agente causal dos enfezamentos presente nas lavouras de milho, nos municípios amostrados no Paraná, durante a safra de 2019, é o espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*).

## Referências

---

BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O.; DALLY, E. L. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, v. 85, n. 5, p. 475-480, 2001.

COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; COTA, L. V.; AGUIAR, F. M. Manejo de doenças na cultura do milho. In: KAPPES, C. (Ed.). **Boletim de pesquisa 2017/2018**: soja, algodão, milho. Rondonópolis: Fundação MT, 2017. p. 274-309.

FIRRAO, G.; ANDERSEN, M.; BERTACCINI, A.; BOUDON, E.; BOVÉ, J. M.; DAIRE, X.; DAVIS, R. E.; FLETCHER, J.; GARNIER, M.; GIBB, K. S.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; HARRISON, N.; HIRUKI, C.; KIRPATRICK, B. C.; JONES, P.; KUSKE, C. R.; LEE, I. M.; LIEFTING, L.; MARCONE, C.; NAMBA, S.; SCHNEIDER, B.; SEARS, B. B.; SEEMÜLLER, E.; SMART, C. D.; STRETEN, C.; WANG, K. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International**

**Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1243-1255, 2004.

LEE, I. M.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 221-255, 2000.

LEE, I. M.; HAMMOND, R. W.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN D. E. Universal Amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organism. **Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 834-842, 1993.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, v. 35, n. 2, p. 165-175, 1990.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v. 70, p. 659-662, 1980.

OLIVEIRA, E. de; LANDAU, E. C.; GUIMARÃES, P. E. de O.; GUIMARÃES, L. J. M. Resistência do milho ao enfezamento causado por espiroplasma e ao enfezamento causado por fitoplasma. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. **Potencialidades, desafios e sustentabilidade**: resumos expandidos... Sete Lagoas: ABMS, 2010. 1 CD-ROM.

POLLACK, J.; WILLIAMS, M. V.; MCELHANEY, R. N. The Comparative Metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 269-354, 1997.

SABATO, E. O. Enfezamentos do milho. In: OLIVEIRA, C. M.; SABATO, E. O. (Ed.). **Doenças em milho**: insetos-vetores, mollicutes e viroses. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 11-24.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. 2 ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1986. 105 p.

SILVA, D. D. da; AGUIAR, F. M.; COTA, L. V.; COSTA, R. V. da; MENDES, S. M. Molicutes em milho: a diversificação de sistemas de produção pode ser a solução? In: MEDEIROS, F. H. V.; PEDROSO, L. A.; GUIMARÃES, M. de R. F.; SILVA, B. A. A. de S. e; ALMEIDA, L. G. F. de; SILVA, F. de J.; SILVA, R. L. M. da; FERREIRA, L. C.; PEREIRA, A. K. M.; COUTO, T. B. R.; GOMES, V. A.; MEDEIROS, R. M.; VEIGA, C. M. de O.; SILVA, M. de F.; FIGUEIREDO, Y. F.; GATTI, G. V. N.; NICOLLI, C. P. (Ed.). **Novos sistemas de produção**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2017. p. 32-52.

SILVA, D. D. da; COTA, L. V.; MEIRELLES, W. F.; SOUZA, I. R. P. de; AGUIAR, F. M.; OLIVEIRA, I. R. de; COSTA, R. V. da; MENDES, S. M. **Problemas fitossanitários ocorridos em lavouras de milho na região de Marechal Cândido Rondon, Oeste do Paraná, na safra 2018/2019 e safrinha 2019**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 23 p. Nota técnica.

SOUSA, S. M. de; BARROS, B. de A. Detecção molecular de molicutes em milho. In: OLIVEIRA, C. M. de; SABATO, E. de O. (Ed.). **Doenças em milho: insetos-vetores, molicutes e vírus**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 25-34.

WHITCOMB, R. F.; CHEN, T. A.; WILLIAMSON, D. L.; LIAO, C.; TULLY, J. G.; CLARK, T. B.; BOVÉ, J. M.; MOUCHES, C.; ROSE, D. L.; COAN, M. E. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: characterization of the etiological agent of corn stunt disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 170-178, 1986.



---

## *Milho e Sorgo*



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL